製品コード CY205

食品・環境分析用

TaKaRa

Cycleave®PCR *Salmonella* Detection Kit Ver. 2.0

説明書

v201406Da

目次

概要 3

I. キットの内容 4

II. 保存 4

III. キット以外に必要な試薬、機器 4

IV. 操作上の注意 5

V. 操作 5

V-1. サンプルの調製 6

V-2. 反応液の調製と反応開始 6

V-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出、判定 7

Thermal Cycler Dice® Real Time System *III* の場合 7

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 11

VI. 判定結果表 13

VII. （参考）食品からの PCR 検出方法の一例 14

VIII. 参考文献 14

IX. 関連製品 14

X. 注意 15

サルモネラは大腸菌や赤痢菌と同じグループに属する細菌で、自然界中に広く分布し、2,500 種類以上もの血清型が知られています。現在、これらの中でも特に、サルモネラ エンテリティディス（*Salmonella* Enteritidis）による食中毒が急激に増加しています。
本キットは、ほとんどすべてのサルモネラが保有している遺伝子のひとつである、侵入性因子関連遺伝子 *invA* をリアルタイム PCR 装置を用いて検出するキットです。本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HS を使用しており、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することが出来ます。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります（図 1 参照）。
この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることが出来ます。
本キットにはサルモネラの侵入性因子関連遺伝子 *invA* 検出用 FAM 標識プローブ、ならびにインターナルコントロールとインターナルコントロール検出用 ROX 標識プローブが含まれています。
二波長を同時にモニタリングすることで、一本のチューブで *invA* 遺伝子の検出と、インターナルコントロール DNA の検出による偽陰性のモニターが可能です。リアルタイム PCR による検出なので、電気泳動が不要であり、迅速に結果が得られます。
また、Ver. 2.0 では従来品の各コンポーネントのプレミックス化を行い、検出操作の簡便化を図っています。

＜ご注意＞

本製品は一部仕様を変更したため、Lot. AK701 より、Smart Cycler System でのご使用を推奨しておりません。Thermal Cycler Dice Real Time System や Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System 等でご使用ください。

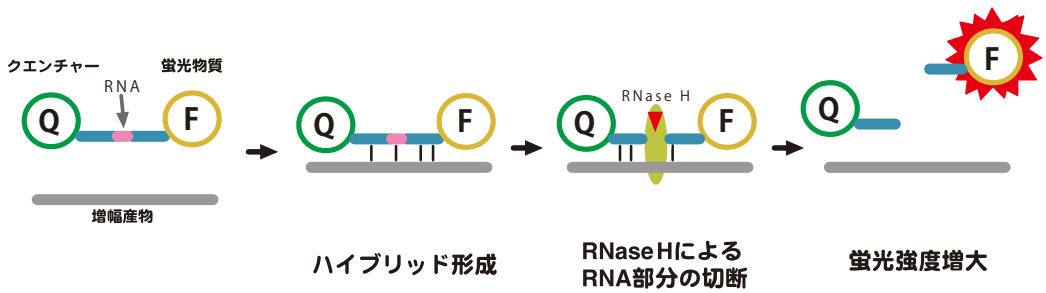


図1. サイクリングプローブ法の原理

I. キットの内容（25 μl 反応 × 50 回分）

1.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 μl
2.	SIN Primer/Probe Mix（FAM, ROX 標識）＊	5 × conc.	250 μl
3.	dH_2O		1 ml
4.	SIN Positive Control		150 μl（30 回分）

＊：プライマーは株式会社島津製作所で製造されたものです。蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。

【コンポーネントの説明】

2 × Cycleave Reaction Mixture：
酵素、Buffer、dNTP mixture、インターナルコントロール DNA を含む PCR 反応試薬です。

SIN Primer/Probe Mix：
侵入性因子関連遺伝子 *invA* 検出用プライマー・プローブの混合溶液です。プライマーにより、*invA* 遺伝子（ターゲット遺伝子）およびインターナルコントロール DNA を増幅し、FAM 標識プローブにより *invA* 遺伝子を、ROX 標識プローブによりインターナルコントロール DNA を検出します。

ターゲット遺伝子：
標的となる遺伝子。このキットの場合、サルモネラの侵入性因子関連遺伝子 *invA* のことです。

インターナルコントロール DNA：
ターゲット遺伝子とは無関係な配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。全ての反応系に存在させることで、ターゲットが検出されない場合にインターナルコントロール DNA の検出ができていれば、PCR 阻害が起こっていないと判断でき、サンプル中のターゲットが検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロール DNA がともに検出されないなら、PCR が正常に進まなかったことがわかります。なお、ターゲットの DNA 量が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロール DNA のシグナルの立ち上がりが遅くなったり、シグナル強度が弱くなるあるいはシグナルが得られない場合があります。この場合、ターゲットは陽性であると判定できます。

dH_2O：滅菌水です。

SIN Positive Control：*invA* 遺伝子用陽性コントロールです。

II. 保存

－ 20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

【機器】

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
食品環境検査用ソフトウェア
または、Thermal Cycler Dice Real Time System Software
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）など
ヒートブロック（95℃まで温度を上げられるもの）

※ チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 8 連 0.2 ml チューブを Thermal Cycler Dice Real Time System 専用として販売しています。チューブ間のコンタミの危険性が軽減できるので特にお勧めします。
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat caps（製品コード NJ600）

【その他】

1,000 μl、200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
卓上遠心機
微量高速遠心機（4℃設定可能）

IV. 操作上の注意

1）リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。

2）万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。

3）陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を用いて確認してください。

4）反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

○ エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
○ エリア 2：検体の調製を行います。
○ エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

5）本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。
リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

V. 操作

1. サンプルの調製
   増菌培養液から菌体熱抽出サンプルを調製する
2. リアルタイム PCR 装置のセッティング
3. 反応液の調製と反応開始
   反応液を調製する
   ↓
   反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する
   ↓
   反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する
   ↓
4. 結果表示
   画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される
   ↓
   反応終了
   ↓
   判定

V-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

［菌体熱抽出サンプルの調製］

（1）増菌培養液 10 μl を 1.5 ml チューブに採る。
（2）滅菌蒸留水 90 μl を加えて混合する。
（3）95℃で 5 分間熱処理する。
（4）遠心分離（12,000 rpm、4℃、10 分）し、上清を回収する。

これを *invA* 遺伝子検出用の熱抽出サンプルとして 1 反応に 5 μl 使用する。

※ この方法で調製した熱抽出サンプルを用いて PCR を行ったときに反応が阻害されるようであれば、滅菌蒸留水で 10 倍希釈液、100 倍希釈液を調製し、PCR 反応に用いる。
※ 増菌培養液は、それぞれ適当な標準プロトコールに従って、食品サンプルなどから調製したものを用いる。また、熱抽出サンプルは－ 20℃で保存可能である。

V-2. 反応液の調製と反応開始

本キットでは、1 本の反応チューブ内で *invA* 遺伝子とインターナルコントロールの増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、*invA 遺*伝子の陽性コントロール反応および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

（1）下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、滅菌水 5 μl を加えしっかりとふたをする。
必要本数は、サンプル数＋ 2 本（陰性コントロール反応として滅菌水を加えたもの、陽性コントロール反応）と設定する。

	液量（1 反応）	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
SIN Primer/Probe Mix（5 × conc.）	5 μl	1 ×
検体サンプル or SIN Positive Control or 滅菌水	（5 μl）＊	
dH_2O	2.5 μl	
Total	25 μl	

＊：検体サンプルまたは SIN Positive Control は、ステップ（2）で加えるため、ここでは加えない。

【注意】
蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。
（エリア 3 へ移動）

（2）サンプル（鋳型）の添加（エリア 3 で実施）

陰性コントロール以外の各チューブに、検体サンプルまたは SIN Positive Control を添加し、しっかりとふたをする。
反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】
反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

V-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出、判定（エリア 3 で実施）

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。
ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System II および 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）を使用した場合の簡単な操作方法と、結果の判定について示します。

【Thermal Cycler Dice Real Time System II の場合】
（食品環境検査用ソフトウェア）

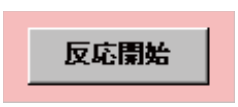
（1）ランファイルを新規作成し、" 新規測定 " 画面において解析タイプ＜＋／－判定（CycleavePCR Kit）＞を選択する。

※ ＋／－判定（CycleavePCR Kit）は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、＜(PM) Plus/Minus Assay 解析＞を使用します。
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイト資料請求のダウンロードサービス「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

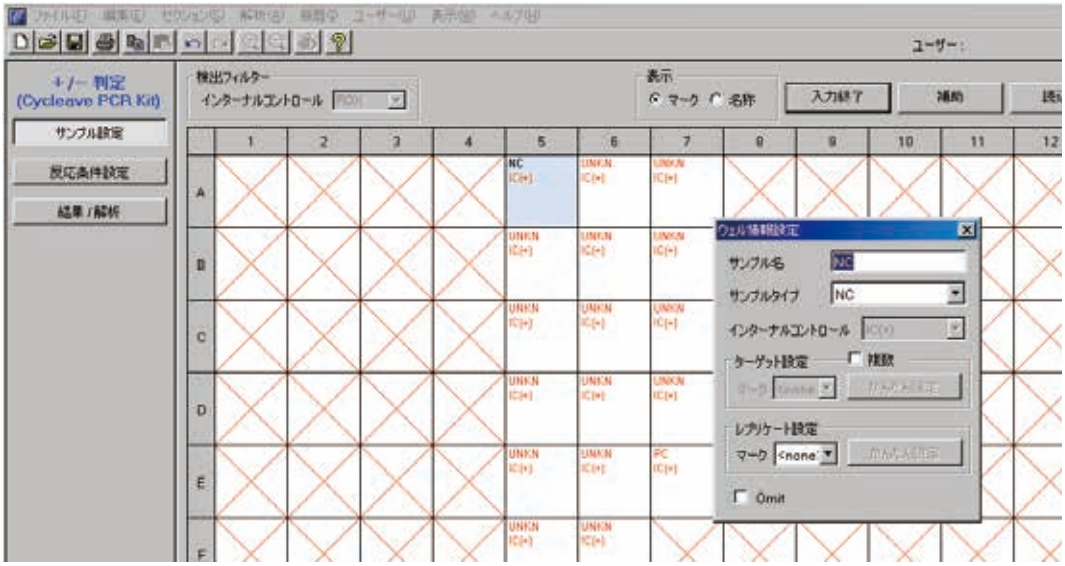
（2）" 反応条件設定 " 画面で PCR 条件が以下の条件になっていることを確認する。

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3 step PCR
　Cycle：45
　95℃　 5 秒
　55℃　10 秒
　72℃　20 秒（検出）

（3）画面右下の " 反応開始 " ボタンをクリックして反応を開始する。



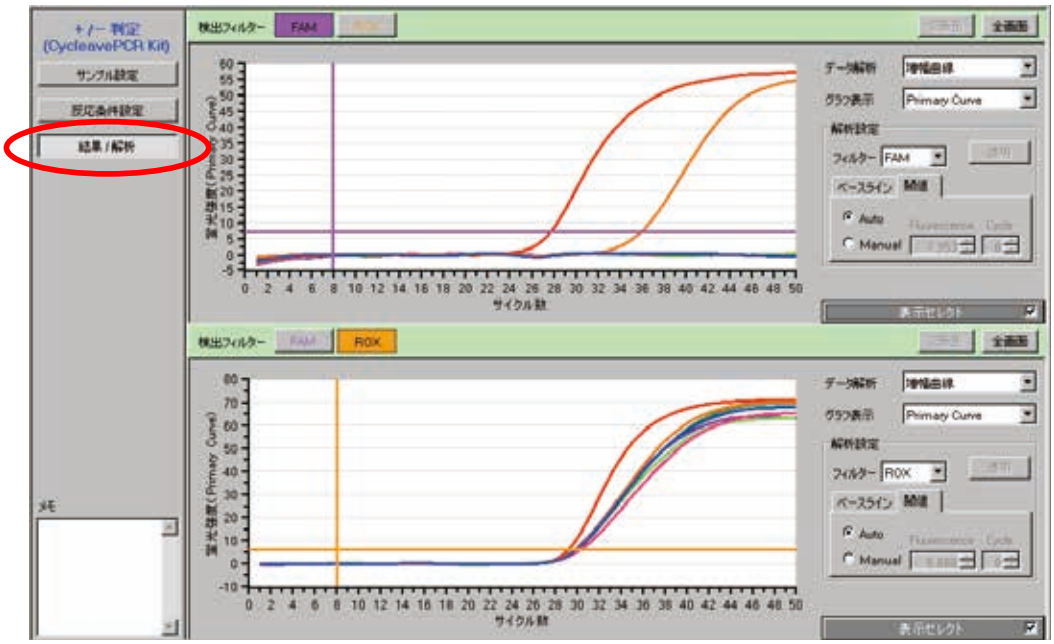
(4) “ サンプル設定 ” 画面で “ 入力 ” ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルは Omit 設定する。



インターナルコントロールは、デフォルトで ROX に設定されている（変更できません）。判定の信頼性を高めるため、2 連以上での反応を推奨する。

(5) 結果解析

1. 反応終了後、“ 結果 / 解析 ” ボタンをクリックする。



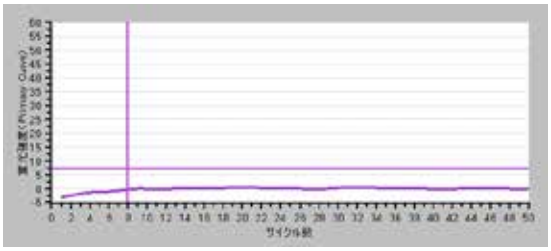
2 画面の上部にターゲット遺伝子検出の FAM フィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール（IC）検出の ROX フィルターでの増幅曲線が表示される。

【注意】
増幅曲線の形状を確認し、ベースラインと閾値が適切に設定されていることを確認してください。
Run が終了すると、自動的にベースラインと閾値は Auto で設定され、解析が行われますが、Auto で適切に設定されていない場合には、Manual で設定し直してください。
ベースラインと閾値の設定については、装置に添付されている取扱説明書＜ソフトウェア・操作編＞の「5-2. データ解析 (1) 解析パラメーターの設定」または弊社ウェブサイトの製品ページをご参照ください。

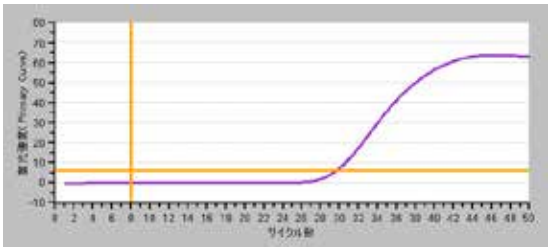
2. NC（陰性コントロール）、PC（陽性コントロール）での増幅曲線を確認する。

NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ N ＞を選択
FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
（ターゲット遺伝子検出）

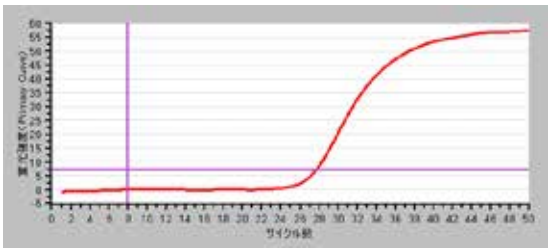


ROX フィルター
（IC 検出）

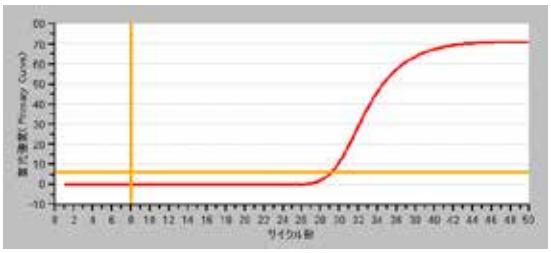


PC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ P ＞を選択
FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
（ターゲット遺伝子検出）



ROX フィルター
（IC 検出）



3. サンプルの結果を、表示セレクトで＜ U ＞を選択し増幅曲線を確認する。

(6) 結果の表示
　　データ解析＜判定結果＞を選択する。

総合判定結果の表示について
　陰性コントロール＜ N ＞、陽性コントロール＜ P ＞の表示
　　OK：　コントロール反応が正常（反応系が正しく進んでいる。）
　　OUT：　コントロール反応が異常（反応系が正しく進んでいない。）

　検体サンプル＜ U ＞の表示
　　Posi.：　ターゲット遺伝子の検出が陽性
　　Nega.：　ターゲット遺伝子が検出限界以下
　　ND：　判定不能（PCR 反応が正しく進まなかった。）
　　インターナルコントロール、ターゲット遺伝子とも検出せず、判定不能。
　　Error：　同一レプリケート番号の判定が異なる。

　※ 判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

■判定結果についての注意事項

(1) 陰性コントロール反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
　● ターゲット遺伝子検出において、増幅曲線が得られた。
　→ 試薬中に目的産物が混入した可能性がある。再度、コンタミネーションに注意し反応を行う。

(2) 陽性コントロール DNA 反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
　● ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
　→ 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。

　● インターナルコントロール（ROX）では増幅曲線が得られるが、ターゲット遺伝子（FAM）では増幅曲線が得られなかった。
　→ Primer/Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロール DNA が分解している可能性がある。

(3) 検体サンプル反応において、総合判定解析が「ND」となった。
　● ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
　→ サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈する、または検体サンプルの再調製を行った後、再反応を行う。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）の場合】

増幅反応は以下の手順で行う。

（1） Advanced Setup で New Experiment を作成する。

（2） Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。（Other を選択した場合は Include Melt Curve の☑は外しておく。）

（3） Plate Setup の Define Target にて Target Name を SIN、Reporter を FAM、Quencher を（none）にしたものを作成する。

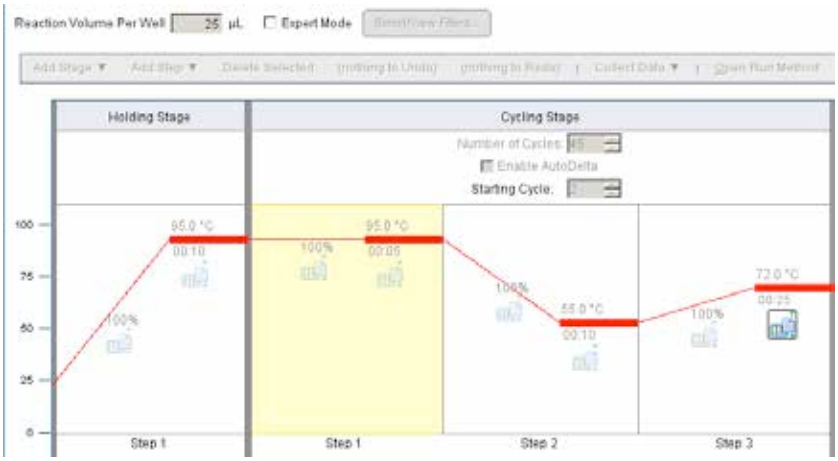
（4） Plate Setup の Define Target にて Target Name を IC、Reporter を ROX、Quencher を（none）にしたものを作成する。

（5） Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。

（6） （3）、（4）、（5）で作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
Passive Reference は（none）にする。

（7） Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

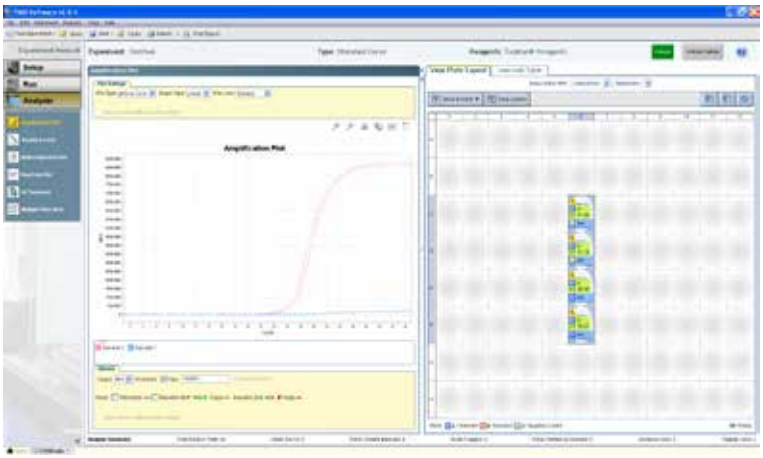
初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃ 10 秒
3 step PCR
　Cycle：45
　95℃ 5 秒
　55℃ 10 秒
　72℃ 25 秒（検出）



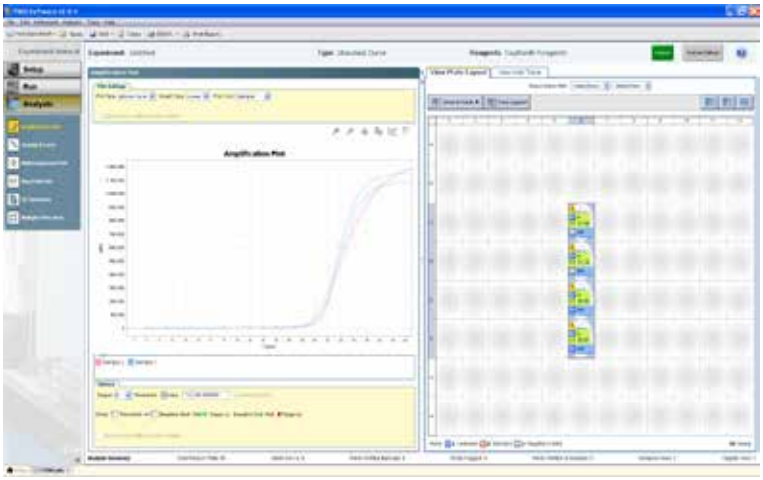
（8） 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

（9） 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線が確認できる。
（Target のプルダウンメニューから各々のターゲットを選択）

※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する必要があります。

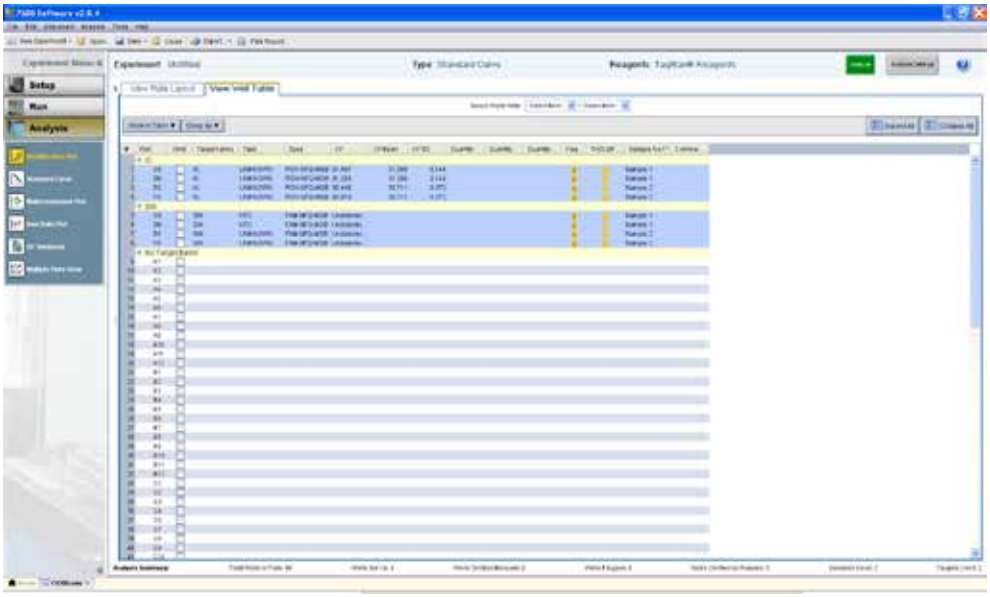


SIN Target の検出（FAM）



Internal Control の検出（ROX）

（10） View Well Table タブをクリックして結果のデータを参照できる。



※ StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）も同様な操作で使用できます。ただし、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX (IC) の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VI. 判定結果表

判定結果表 1：検体サンプルを添加した場合（各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行うこと）

		ROX（インターナルコントロール DNA）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（*invA* 遺伝子）	増幅シグナル（＋）	*invA* 遺伝子陽性＊1	*invA* 遺伝子陽性＊1
	増幅シグナル（－）	*invA* 遺伝子検出限界以下＊2	判定不能＊3

判定結果表 2：陽性コントロール反応（SIN Positive Control を添加したもの）

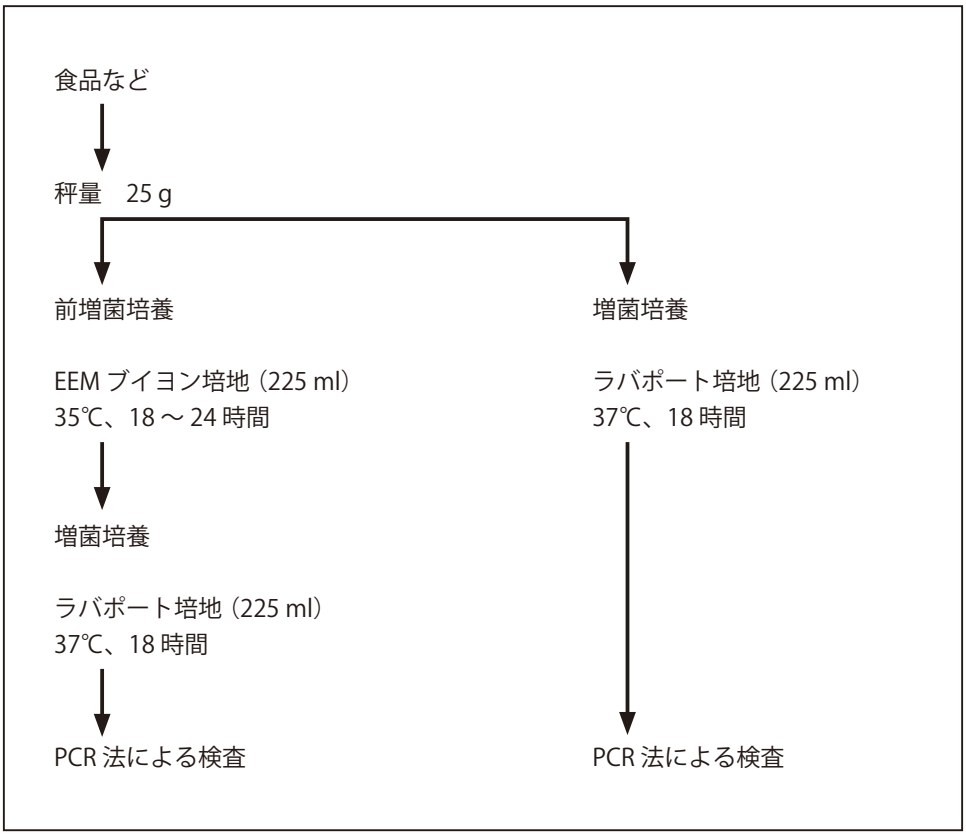
		ROX（インターナルコントロール DNA）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（*invA* 遺伝子）	増幅シグナル（＋）	*invA* 遺伝子検出系に問題なし	*invA* 遺伝子検出系に問題なし
	増幅シグナル（－）	*invA* 遺伝子検出系に問題あり＊4	判定不能＊3

判定結果表 3：陰性コントロール反応（滅菌蒸留水を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール DNA）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（*invA* 遺伝子）	増幅シグナル（＋）	*invA* 遺伝子検出系にコンタミネーションの疑い＊5	*invA* 遺伝子検出系にコンタミネーションの疑い＊5
	増幅シグナル（－）	*invA* 遺伝子検出系にコンタミネーションはない	判定不能＊3

＊1：インターナルコントロール DNA 検出結果の（＋）/（－）に関わらず、*invA* 遺伝子陽性である。陰性コントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
＊2：陽性コントロールの検出結果が（＋）となる（反応系に問題がない）ことを確認すること。
＊3：何らかの原因で PCR 反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の再調製が必要。
＊4：ターゲット遺伝子増幅用プライマーあるいはターゲット遺伝子検出用プローブに問題があるか、SIN Positive Control が分解している。
＊5：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

VII.（参考）食品からの PCR 検出方法の一例



VIII. 参考文献

1）Saiki, R. *et al*. (1985) *Science*, **37**, 170-172
2）大橋鉄雄ら：(1995) 第 16 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 pp61
3）Galan, J. E. *et al*. (1992) *J. Bacteriol*., **174**, 4338-4349
4）Ashok, K *et al*. (1994) *Microb. Pathog*., **19**, 85-95

IX. 関連製品

Viable *Salmonella* Selection Kit for PCR（製品コード 7711）

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
96 well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）

X. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cycleave、Thermal Cycler Dice、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201406Da